

\* NOTICES \*

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] A gene therapy agent of cancer containing an effector cell which introduced cytokine genes, and a tumor vaccine which introduced cytokine genes into tumor cells.

[Claim 2] The gene therapy agent according to claim 1 whose effector cell is a lymphocyte which participates in destruction of a cancer cell.

[Claim 3] The gene therapy agent according to claim 2 whose lymphocyte is tumor permeation lymphocyte (TIL), lymphokine-activating-killer-cells (LAK), or cytotoxic T-cell (CTL).

[Claim 4] The gene therapy agent according to claim 1 whose tumor cell is a melanoma cell, a renal cancer cell, cancer cells of breast carcinoma, flat epithelial cancer, an adenocarcinoma, a transitional cell carcinoma, sarcomata, or neuroglioma (guru coma).

[Claim 5] The gene therapy agent according to claim 1 whose cytokine genes introduced into an effector cell are interleukin (IL)-2 genes.

[Claim 6] The gene therapy agent according to claim 1 whose cytokine genes introduced into tumor cells are at least one of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene and the interleukin (IL)-2 genes.

[Claim 7] The gene therapy agent according to claim 1 by which cytokine genes were introduced into an effector cell by adenovirus vector.

[Claim 8] The gene therapy agent according to claim 1 by which cytokine genes were introduced into tumor cells by retroviral vector.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] More particularly, this invention relates to the gene therapy

agent of the effector cell which introduced cytokine genes, and the cancer containing the tumor vaccine which introduced cytokine genes into tumor cells about the gene therapy agent of cancer.

[0002]

[Description of the Prior Art] Although cytokine demonstrates anticancer efficacy, it is mainly divided roughly into three of the followings by the action mechanism. Namely, \*\* tumor necrosis factor (TNF) - alpha, beta, interferon (IFN) - like alpha, beta, gamma, and interleukin (IL)-1, What shows direct growth control thru/or obstacle activity by in vitro to a cancer cell, \*\* Interleukin (IL)-2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, the thing that shows anticancer efficacy indirectly via a living body's immunity effector mechanism like 12, \*\* It is used for the prevention and the therapy of a living body's side effects accompanying other carcinostatic therapies like IL-3, IL-6, the granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), and the stem cell factor (SCF).

[0003] The cancer treatment by cytokine-genes introduction is also tried in recent years. These one cytokine genes A lymphocyte (LAK), for example, lymphokine activating killer cells, It introduces into cytotoxic T-cell (CTL), a tumor permeation lymphocyte (TIL), etc., Activate a lymphocyte by autocrine or the paracrine by the cytokine secreted from an introductory cell, and raise passive immunity ability, or, By introducing IFN or the TNF gene which has antitumor nature in TIL directly. . I will improve the antitumor nature in a tumor part. the trial to say is made (Nishihara et al., Cancer Res., 48, 4730, 1988, Miyatakeet al., J. Natl. Cancer Inst., 82, 217, and 1990.) Itoh et al., Jpn. J. Cancer Res., 82, 1203, and 1991. Although the retrovirus is used until now, the introductory efficiency of the cytokine-genes introduction to TIL is dramatically bad, and it has been an obstacle over this approach.

[0004] Another introduces cytokine genes into tumor cells by a retroviral vector etc., uses them as a tumor vaccine, and derives a host's tumor specific immunocyte. For example, the mouse colon cancer which introduced IL[ Fearon and others ]-2 gene, (Fearon et al., Cell, 60, 397, 1990) which has reported that will carry out natural-after take regression if a malignant melanoma is transplanted to an affiliated mouse, and the mouse gains the immunological competence which has resistance to the replantatio of IL-2 gene non introduction tumor cells. However, these are not those from which not necessarily satisfying results are acquired by each to antitumor nature, and examination is not made from the field of the metastasis control effect, and what is considered to be promising to cancer metastasis is not reported by under the present circumstances.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]Therefore, the purpose of this invention is to be able to demonstrate higher antitumor activity and to provide the gene therapy agent of cancer effective also in control of cancer metastasis that the above problems should be solved.

[0006]

[Means for Solving the Problem]If an effector cell which introduced cytokine genes, and a tumor vaccine which introduced cytokine genes into tumor cells are used together as a result of inquiring wholeheartedly about above SUBJECT, this invention persons, It found out that general immunity was derived efficiently and anticancer efficacy and the metastasis control effect were enhanced, and this invention was completed.

[0007]That is, this invention provides a gene therapy agent of cancer containing an effector cell which introduced cytokine genes, and a tumor vaccine which introduced cytokine genes into tumor cells. Gene therapy of cancer said to this invention plans cancer treatment from both sides of antitumor action by cytokine genes, and a metastasis control operation.

[0008]Hereafter, this invention is explained in detail. With cytokine genes used in this invention. A granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, and the interleukin 1 alpha (IL-1alpha). Interleukin receptor 1 Antagonist (IL-1RA), Tumor necrosis factor (TNF) - alpha, lymphotoxin (LT)-beta, and a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), A macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and interferon (IFN)-gamma, A gene which encodes various cytokine, such as macrophage migration inhibition factor (MIF), leukemia inhibitory factor (LIF), the T cell activation costimulatory factor B7 (CD80) and B7-2 (CD86), kit ligand, and the oncostatin M, is said. The various cytokine cDNA already about [Homo sapiens GM-CSF cDNA by which cloning is carried out Wong et al., Science, 228, 810-815 (1985), Homo sapiens IL-2 cDNA -- Taniguchi et al., Nature, 302, and 305-310(1983)]. Homo sapiens About IFN-gamma cDNA, they are Gray et al., Nature, 298, and 859-863(1982)]. Cytokine genes used in this invention, Even if it is cDNA produced by being isolated from a cell using publicly known art, Although it may be chemically compounded in accordance with methods, such as a PORIME race chain reaction (PCR), from information disclosed by above-mentioned document etc., in order to suppress immunological rejection to the minimum, and in order to raise a curative effect, a thing of the Homo sapiens origin is desirable.

[0009]In this invention, an effector cell takes charge of a culmination of destruction of a cancer cell, means a cell population directly engaged in destruction, and specifically means tumor permeation lymphocyte (TIL), lymphokine-activating-killer-cells (LAK),

and cytotoxic T-cell (CTL) etc. Introduction of cytokine genes to these effector cells can be performed very efficiently by using an adenovirus vector. As an adenovirus vector used here, Including an insertion site for cytokine genes, especially if cytokine can be revealed in an introduced effector cell, will not be limited, but. Adex1 of the Homo sapiens 5 type adenovirus origin [Saito, I. et al., J. Virol., 54, and 711-719] (1985) are used suitably.

[0010]On the other hand, with a tumor vaccine said to this invention, the above-mentioned cytokine genes are introduced into isolation (culture) tumor cells by a retroviral vector, X-ray irradiation is performed to this, and production of cytokine stops only growth, without preventing. A host's tumor specific immunocyte can be derived by medicating a host with this tumor vaccine.

[0011]A retroviral vector used here, Including an insertion site for cytokine genes, especially if cytokine can be revealed in introduced tumor cells, it will not be limited, but it is Patent Publication Heisei, for example. 6-503968 MFG and alpha-SCG which are indicated by item gazette, PLJ, pEm, etc. are mentioned. A retroviral vector which inserted cytokine genes, It mixes with a plasmid which has a neomycin resistance gene as a marker which chooses that the target gene was introduced, psi 2, psi-Am , psiCRIP, and psiCRE It introduces into a packaging cell of [Danos et al., PNAS, 85, 6460-6464] (1988), etc. by a calcium coprecipitation Mr. method (KOTORANSUFEKUSHON). Only a cell into which the target gene is introduced is extractable by extracting a cell which furthermore cultivates this under existence of the drugs G418, survives and forms a colony. Next, you make it infected with various tumor cells, such as NIH3 T3 mouse fibrocyte and B16 mouse melanoma cell, using a culture supernatant of these cells, and it can check by Southern hybridization as a stable transgenics cell eventually introduced into a chromosome of a cell. Quantity of cytokine secreted from an infected cell can be measured by immunological assay of ELISA etc.

[0012]Next, this is usually used for tumor cells into which cytokine genes were introduced as a tumor vaccine after irradiating with 10,000-150,000-rad X-rays. Although tumor cells here are a melanoma cell thru/or a renal cancer cell, other tumor cells, for example, cancer cells of breast carcinoma, flat epithelial cancer, an adenocarcinoma, a transitional cell carcinoma, sarcomata, neuroglioma (glioma), etc. can be used. Although a cytokine-genes introduction effector cell and a tumor vaccine which were prepared as mentioned above, respectively can be used as it is, with an excipient permissible in medicine, as a medicinal composition, they can be pharmaceutical-preparation-ized in gestalten, such as a solution, suspension, and gel, and they can also be medicated with them.

[0013]As a dosage form of a gene therapy agent of this invention, local administration, such as partial injection and internal use, can be performed to an anticipation metastasis part corresponding to a cancer type besides whole body administration in the usual vein and an artery etc. as opposed to a carcinogenic lesion. In administration of a gene therapy agent of this invention, a dosage form combined with catheter art, gene transfection technology, or a surgical operation can also be taken. Although a dose of a gene therapy agent of this invention changes with age, sex, condition, a route of administration, frequency of administration, and pharmaceutical forms, generally, it is made into weight of cytokine genes per day by adult, and the range of abbreviation 0.1 - 100 mg is suitable for it.

[0014]

[Effect of the Invention]According to this invention, high antitumor nature can be demonstrated to animals, such as Homo sapiens or a mouse, an ape, a dog, a cat, a horse, and a swine, and a gene therapy agent effective also in control of cancer metastasis is provided, and it is useful to the cancer treatment of minute metastasis.

[0015]

[Example]The following working example explains this invention still in detail. These working example is the things for explanation, and does not limit the range of this invention.

[Reference example 1] mRNA of the splenic lymphocyte of a mouse is used for cDNA of mouse IL-2, mouse GM-CSF, and mouse IFN-gamma, and it is RT-PCR. It prepared by law (Reverse transcripton-polymerase chain reaction). It faced performing PCR and primer #485 shown below and #486 were used to primer #477 shown below, #478, and mouse IFN-gamma to primer #479 shown below, #480, and mouse GM-CSF to mouse IL-2, respectively.

[0016]Primer (#479) : CCGAATTCTAGACACC ATG TAC AGC ATG CAG CTC  
GCA TCC TGT G primer (#480) : C TGT CAA AGC ATC ATC. TCA ACA AGC  
CCT CAA. A TAA GGATCC CC primer (#477). : CCGAATTCTAGACACC ATG.  
TGG CTG CAG AAT TTA. A CTT TTC CTG GGC primer (#478). : C CCC TTT  
GAATGC AAA. AAA CCA AGC CAA AAA. A TGA GGATCC GG primer (#485). :  
CC GAA TTC TAGA CACC ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC TTG GC primer  
(#486) : C AGG AAG CGG AAA AGG AGTCGC TGC TGA GGATCCGG

[0017][Working example 1] Preparation of the preparation TIL of the preparation (1)  
mouse melanoma B16F10 origin TIL of cytokine-genes introduction effector cell  
(TIL/IL-2), Alexander, R.B. et al., J. Immunol., 145, and 1615-1620 (1990), Matis, L.A.  
et al., Methods Enzymol., 150, and 342-351 (1987), Livingstone, A. et al., Methods

Enzymol., 150, and 325-333 Improvement was added to the method of the description (1987) and was performed to it as follows. 6 - B16F10 (Whitehead.) which is the high transition stock of the mouse melanoma B16 (ATCC CRL6322) transplanted to the femininity C57BL/6 mouse (it purchases from Charles River Japan) of ten weeks old the fresh tumor lump of acquisition [ Glenn Dranoff / Institute Dr.] -- the inside of a full culture culture medium (CM) -- 4 \*\* --  $5 \times 10^7$  cells/ml -- it was suspended. 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine which carried out heat inactivation of CM,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, 100 It is mug/ml streptomycin, 0.5 mug/ml amphotericin B , 10mM3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, and RPMI 1640 that added 70U/ml recombination Homo sapiens IL-2 (it receives from Shionogi & Co., Ltd.). They are equivalent weight of anti-CDs about TIL.-8-It mixes with a joint immune adsorption bead by  $1 \times 10^8$ /ml, and is 2 at 4 \*\*. Time incubation was carried out. pelletizing the bead to which TIL adhered -- cold CM -- three -- carrying out time washing -- the inside of CM --  $1 \times 10^7$  beads/ml -- it was suspended, scattered on the tissue culture plate of 24 wells, and incubated under 37 \*\* and 5%CO<sub>2</sub>. The bead separated from TIL was pelletized and removed one day after culture. The exposure (10,000 rads) tumor cells of a  $2 \times 10^5$  individual and the exposure (3,000 rads) normal splenic cells of the  $1 \times 10^6$  individual were used and stimulated per well to separated TIL. in It is a vitro stimulus 7 It repeated day by day [ 14 ] from the day. isolating TIL preparatively, when it becomes confluent -- the inside of new CM --  $2 \times 10^5$  cell/ml -- it was re-suspended.

[0018](2) The method of preparing the introductory recombinant adenovirus to TIL of mouse IL-2 gene by adenovirus was performed by Saito, I. et al., J. Virol., and the strange method of 54,711-719 (1985). Namely, a cytomegalovirus enhancer, a chicken beta-actin promotor, The manifestation unit [Niwa, H. et al., J. Gene 108, and 193-200] (1991) which consists of cDNA arrangement of mouse IL-2 prepared by the reference example 1, and a rabbit beta globin poly (A) signal sequence, pAdex1w (Hiromi Kanegae.) which is 42kb cosmid including the adenovirus type 5 of 31kbs lacking inA [ E1 ], E1B, and E3 gene The cosmid cassette for a manifestation was built by inserting in Shizuko Harada, Izumi Saito, and experimental-medicine bio-manual 4, 189-204, 1994, and the SwaI restriction enzyme part of Yodosha (drawing 1). They are this cosmid cassette for a manifestation, and an adenovirus DNA-terminal protein complex (DNA-TPC) 293 KOTORANSUFEKUTO [ the cell (ATCC CRL1573) / with the calcium coprecipitation method ]. The recombinant virus containing an expression cassette was checked by digestion by a suitable restriction enzyme. A recombinant virus continues and is 293. It was made to increase in a cell and the virus solution was stored

by -80 \*\*. The plaque assay on 293 cells determined the titer of the virus stock. (1) for in vitro infection of the adenovirus to TIL come out of and prepared, culture medium was removed from the TIL cell scattered on 12-well culture plate, and virus stock 150 mul was added to each well. 37 \*\* -- 1 -- adding the culture medium for growth after a time incubation -- a TIL cell -- 2-3 -- it Japanese-cultivated and mouse IL-2 transgenics TIL cell (TIL/IL-2) was obtained.

[0019][Working example 2] tumor vaccine (B16F10/IL-2.) + Preparation (1) mouse IL-2 of a GM-CSF vaccine, the preparation retroviral vector MFG (Proc. Dranoff, G. et al.) of a mouse GM-CSF quantity titer recombinant retrovirus production clone LTR of Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3539-3543, and 2 \*\* of 1993 EagI/BamHI fragmentation included (Long Terminal Repeat) (5200bp), every of mouse IL-2 prepared by EagI/XbaI fragmentation (1000bp) and the reference example 1, and mouse GM-CSF -- three of the XbaI/BamHI fragmentation of cDNA were connected by T4DNA ligase, and it included in the plasmid (drawing 2). The plasmid and pPGKneo which were obtained [H. Takeshima et al., Nature, 369, and 556-559] (1994) by a calcium coprecipitation Mr. method. It introduces into psiCRIP [Danos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, and 6460] (1988), This was cultivated for one week in the culture medium containing G-418 (GIBCO, 1 mg/ml), and the cell which forms a colony was extracted. Next, it is polybrene (Sigma and 8 microg/ml) about the culture supernatant of these cells. You made it infected with NIH3 T3 mouse fibrocyte (ATCC CRL1658) under existence. The genomic DNA of the infected cell was isolated, the titer of a virus was measured and the Southern blot technique estimated it as a copy number of the incorporated provirus. The introductory efficiency to NIH3 T3 is usually 1. It was 1 - 3 copy number in inclusion of a provirus per cell. 10-cm in which the cytokine secreted from an infected cell contains 10 ml of culture media 48 hours after scattering a  $1 \times 10^6$  cell to a dish, it assayed by ELISA (Endogen) (Table 1).

[0020]

[Table 1]

----- cDNA titer (copy number) Expression amount .

----- mouse IL-2 2.0 6350 IU/ml mouse GM-CSF 2.0 13.5 ng/ml

-----[0021](2) It is the mouse melanoma B16 (ATCC.) about the high titer recombinant retrovirus production clone of mouse IL-2 and each mouse GM-CSF selected by preparation (1) of a tumor vaccine (B16F10/IL-2+GM-CSF vaccine). It introduced into B16F 10 (it receives from Whitehead Institute Dr.Glenn Dranoff) which is a high transition stock of CRL 6322. This transgenics cell was maintained by the Eagle's medium of Dulbecco who added fetal calf serum and 2mM

glutamine 10%, was processed by trypsin/EDTA, and irradiated with 10,000-rad X-rays using HITACHI MBR-1505 R X-ray generator. The exposure cell was washed twice by HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), was re-suspended to HBSS by  $5 \times 10^6$  cell/ml concentration, and obtained the tumor vaccine (B16F10 / IL-2+GM-CSF vaccine).

[0022][Working example 3] Cytokine-genes introduction effector cell

(TIL/IFN-gamma) It prepared by the same method as preparation working example 1

(1) of the preparation (1) mouse melanoma B16F10 origin TIL.

(2) The method of preparing the introductory recombinant adenovirus to TIL of the mouse IFN-gamma gene by adenovirus was performed by Saito, I. et al., J. Virol., and the strange method of 54,711-719 (1985). Namely, a cytomegalovirus enhancer, a chicken beta-actin promotor, The manifestation unit [Niwa, H. et al., J. Gene 108, and 193-200] (1991) which consists of cDNA arrangement of mouse IFN-gamma prepared by the reference example 1, and a rabbit beta globin poly (A) signal sequence, pAdex1cw (Hiromi Kanegae.) which is 42kb cosmid including the adenovirus type 5 of 31kbs lacking inA [ E1 ], E1B, and E3 gene The cosmid cassette for a manifestation was built by inserting in Shizuko Harada, Izumi Saito, and experimental-medicine bio-manual 4, 189-204, 1994, and the Clal restriction enzyme part of Yodosha (drawing 1). They are this cosmid cassette for a manifestation, and an adenovirus DNA-terminal protein complex (DNA-TPC) 293 KOTORANSUFEKUTO [ the cell (ATCC CRL1573) / with the calcium coprecipitation method ]. The recombinant virus containing an expression cassette was checked by digestion by a suitable restriction enzyme. A recombinant virus continues and is 293. It was made to increase in a cell and the virus solution was stored by -80 \*\*. The titer of a virus stock is 293. The plaque assay on a cell determined. (1) for in vitro infection of the adenovirus to TIL come out of and prepared, culture medium was removed from the TIL cell scattered on 12-well culture plate, and virus stock 150 mul was added to each well. 37 \*\* -- 1 -- adding the culture medium for growth after a time incubation, and culturing a TIL cell for 2 - three days -- mouse IFN-gamma transgenics TIL cell (TIL/IFN-gamma) It obtained.

[0023][It prepared by the same method as preparation working example 2 (1) of the preparation (1) mouse GM-CSF quantity titer recombinant retrovirus production clone of a working example 4] tumor vaccine (B16F10/GM-CSF vaccine).

(2) . A tumor vaccine (B16F10/GM-SCF vaccine). B16F10 (WhiteheadInstitute.) which is a high transition stock of the mouse melanoma B16 (ATCC CRL 6322) about the high titer recombinant retrovirus production clone of mouse GM-CSF selected by \*\*\*\*\* (1) It introduced into acquisition from Dr.Glenn Dranoff. This transgenics cell was maintained by the Eagle's medium of Dulbecco who added fetal calf serum and

2mM glutamine 10%, was processed by trypsin/EDTA, and irradiated with 10,000-rad X-rays using HITACHI MBR-1505 R X-ray generator. An exposure cell is 2 at HBSS. Time washing was carried out, it was re-suspended to HBSS by  $5 \times 10^6$  cell/ml concentration, and the tumor vaccine (B16F10 / GM-CSF vaccine) was obtained.

[0024][Working example 5] Preparation of the preparation TIL of the preparation (1) mouse colon cancer Colon 26 origin TIL of cytokine-genes introduction effector cell (TIL/IL-2, TIL/IFN-gamma), Alexander, R.B. et al., J. Immunol., 145, and 1615-1620 (1990), Matis, L.A. et al., Methods Enzymol., 150, and 342-351 (1987), Improvement was added to the method of Livingstone, A. et al., Methods Enzymol., 150, and 325 -333 (1987) description, and was performed to it as follows. 6 - the fresh tumor lump of mouse colon cancer Colon 26 which transplanted to the feminity BALB/C mouse (it purchases from Charles RiverJapan) of ten weeks old -- the inside of a full culture culture medium (CM) -- 4 \*\* --  $5 \times 10^7$  cells/ml -- it was suspended. 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine which carried out heat inactivation of CM,  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, It is 100 microg [ /ml ] streptomycin, 0.5 mug/ml amphotericin B , 10mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, and RPMI 1640 that added 70U/ml recombination Homo sapiens IL-2 (it receives from Shionogi & Co., Ltd.). TIL is mixed with equivalent weight of anti-CD-8-joint immune adsorption beads by  $1 \times 10^8$ /ml, and it is 2 at 4 \*\*. Time incubation was carried out. pelletizing the bead to which TIL adhered -- cold CM -- three -- carrying out time washing -- the inside of CM --  $1 \times 10^7$  beads/ml -- it was suspended, scattered on the tissue culture plate of 24 wells, and incubated under 37 \*\* and 5%CO<sub>2</sub>. The bead separated from TIL was pelletized and removed one day after culture. The exposure (10,000 rads) tumor cells of a  $2 \times 10^5$  individual and the exposure (3,000 rads) normal splenic cells of the  $1 \times 10^6$  individual were used and stimulated per well to separated TIL. The invitro stimulus was repeated day by day [ 14 ] from the 7th. isolating TIL preparatively, when it becomes confluent -- the inside of new CM --  $2 \times 10^5$  cell/ml -- it was re-suspended.

[0025](2) Mouse IL-2cDNA prepared by the reference example 1 to TIL prepared above (1) by the same method as introductory working example 1 to TIL of mouse IL-2 gene by adenovirus (2) was introduced, and the mouse IL-2 transgenics TIL cell (TIL/IL-2) was obtained.

(3) Mouse IFN-gamma cDNA prepared by the reference example 1 to TIL prepared above (1) by the same method as introductory working example 3 to TIL of the mouse IFN-gamma gene by adenovirus (2) was introduced, and the mouse IFN-gamma transgenics TIL cell (TIL/IFN-gamma) was obtained.

[0026][It prepared by the same method as preparation working example 2 (1) of the

preparation (1) mouse IL-2 quantity titer recombinant retrovirus production clone of a working example 6] tumor vaccine (Colon26/IL-2 vaccine).

(2) The IL-2 quantity titer recombinant retrovirus production clone selected by preparation (1) of a tumor vaccine (Colon26/IL-2 vaccine) was introduced into mouse colon cancer Colon26. This transgenics cell was maintained by RPMI1640 culture medium which added fetal calf serum and 2mM glutamine 10%, and irradiated with 10,000-rad X-rays using HITACHI MBR-1505 R X-ray generator. An exposure cell is 2 at HBSS. Time washing was carried out, it was re-suspended to HBSS by  $5 \times 10^6$ cell/ml concentration, and the tumor vaccine (Colon26/IL-2 vaccine) was obtained.

[0027][The example 1 of an examination] The effect examination (1) in a lung metastasis system

Femininity [ of six to 10 weeks old ] C57BL/6 Mouse melanoma B16F10 cell of the  $4 \times 10^5$  individual was inoculated into the mouse (it purchases from Charles River Japan) at the caudal vein, and lung metastasis was made to induce. [As for E/T ratio=10:E/T, a several/effectector cell (TIL/IL-2) tumor cell (B16F10) number is expressed]. . [ which prescribed for the patient TIL/IL-2 prepared in TIL independence or working example 1 from the  $4 \times 10^6$  individual vein two days afterward ] B16F10/IL-2 simultaneously prepared in working example 2  $5 \times 10^5$  individual hypodermic administration of the +GM-CSF vaccine was carried out. The number of transition tubercles which was dissected 16 days afterward and produced in the lung from lung metastasis induction was counted. It examined also about what does not perform vaccination only by TIL independence or TIL/IL-2 administration as comparison. A result is shown in Table 2 and drawing 3.

[0028]

[Table 2]

薬 剤		肺転移結節数	コントロール比(%)
エフェクター	ワクチン		
—	—	206±37	100.0
TIL	—	176±25	85.4
TIL	B16F10/IL-2 + GM-CSF	87±26	42.2
TIL/IL-2	—	138±34	67.0
TIL/IL-2	B16F10/IL-2 + GM-CSF	44±25	21.4

[0029]TIL/IL-2 and B16F10/IL-2 By the group which used together and prescribed +GM-CSF vaccine for the patient, especially, reduction of the remarkable number of metastasis tubercles was accepted, and it has checked that the cancer metastasis control effect to a lung served as the maximum.

[0030][The example 2 of an examination] effect examination (2) in a lung metastasis system

6 - mouse melanoma B16F10 cell of the  $3 \times 10^5$  individual was inoculated into the femininity C57BL/6 mouse (it purchases from Charles River Japan) of ten weeks old at the caudal vein, and lung metastasis was made to induce TIL/IFN-gamma prepared in TIL independence or working example 3 was prescribed for the patient from the  $4.5 \times 10^6$  individual vein two days afterward (E/T ratio=15).  $5 \times 10^5$  individual hypodermic administration of the B16F10/GM-CSF vaccine simultaneously prepared in working example 4 was carried out. The number of transition tubercles which was dissected 16 days afterward and produced in the lung from lung metastasis induction was counted. It examined as comparison also about TIL independence, the thing which does not perform vaccination only by TIL/IFN-gamma administration, or B16F10/GM-CSF vaccination. A result is shown in Table 3 and drawing 4.

[0031]

[Table 3]

薬 剤		肺転移結節数	コントロール比(%)
エフェクター	ワクチン		
—	—	303±29	100.0
TIL	—	253±26	83.5
TIL/IFN-γ	—	117±35	38.6
TIL	B16F10/GM-CSF	102±17	33.7
TIL/IFN-γ	B16F10/GM-CSF	52±9	17.2
—	B16F10/GM-CSF	133±45	43.9

[0032]By the group which used together and prescribed TIL/IFN-gamma and a B16F10/GM-CSF vaccine for the patient, especially, reduction of the remarkable number of metastasis tubercles was accepted, and it has checked that the cancer metastasis control effect to a lung served as the maximum.

[0033][The example 3 of an examination] The effect examination (3) in a lung metastasis system

6 - mouse melanoma colon cancer Colon26 cell of the  $2 \times 10^4$  individual was inoculated into the femininity BALB/C mouse (it purchases from Charles River Japan) of ten weeks old at the caudal vein, and lung metastasis was made to induce TIL/IL-2 or TIL/IFN-gamma prepared in TIL independence or working example 5 was prescribed for the patient from the  $1 \times 10^6$  individual vein two days afterward (E/T ratio=50).  $5 \times 10^5$  individual hypodermic administration of the Colon26/IL-2 vaccine simultaneously prepared in working example 6 was carried out. The number of transition tubercles which was dissected 18 days afterward and produced in the lung from lung metastasis

induction was counted. It examined as comparison also about TIL independence, the thing which does not perform vaccination only by TIL/IFN-gamma administration, or Colon26/IL-2 vaccination. A result is shown in Table 4 and drawing 5.

[0034]

[Table 4]

薬 剤		肺転移結節数	コントロール比(%)
エフェクター	ワクチン		
—	—	228±11	100.0
TIL	—	105±29	46.1
TIL/IL-2	—	25±14	11.0
TIL/IFN-γ	—	54±11	23.7
TIL	Colon26/IL-2	32±21	14.0
TIL/IL-2	Colon26/IL-2	9±8	3.9
TIL/IFN-γ	Colon26/IL-2	21±12	9.2
—	Colon26/IL-2	53±10	23.2

[0035]TIL/IFN-gamma, Colon26/IL-2 vaccine, or TIL/IL-2 and Colon26/IL-2 By the group which used together and prescribed the vaccine for the patient, especially, reduction of the remarkable number of metastasis tubercles was accepted, and it has checked that the cancer metastasis control effect to a lung served as the maximum.

---

#### DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1]Construction of the cassette for a manifestation used for IL-2 transgenics is shown.

[Drawing 2]Construction of the recombination retroviral vector used for IL-2 or GM-CSF transgenics is shown.

[Drawing 3]The result of the cancer metastasis control effect by the mouse melanoma (B16F10) vaccine which introduced the mouse melanoma (B16F10) origin effector cell (TIL) which introduced cytokine genes (IL-2), and cytokine genes (IL-2+GM-CSF) is shown.

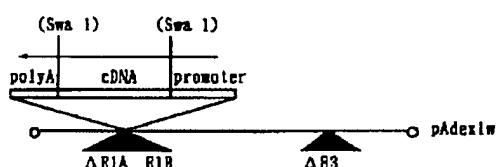
[Drawing 4]The result of the cancer metastasis control effect by the mouse melanoma (B16F10) vaccine which introduced the mouse melanoma (B16F10) origin effector cell (TIL) which introduced cytokine genes (IFN-gamma), and cytokine genes (GM-CSF) is shown.

[Drawing 5]The result of the cancer metastasis control effect by the mouse colon cancer (Colon26) vaccine which introduced the mouse colon cancer (Colon26) origin effector

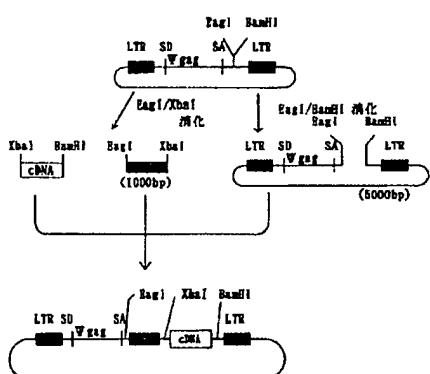
cell (TIL) which introduced cytokine genes (IL-2 or IFN-gamma), and cytokine genes (IL-2) is shown.

## DRAWINGS

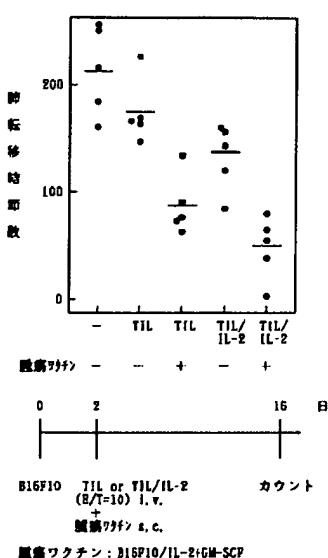
### [Drawing 1]



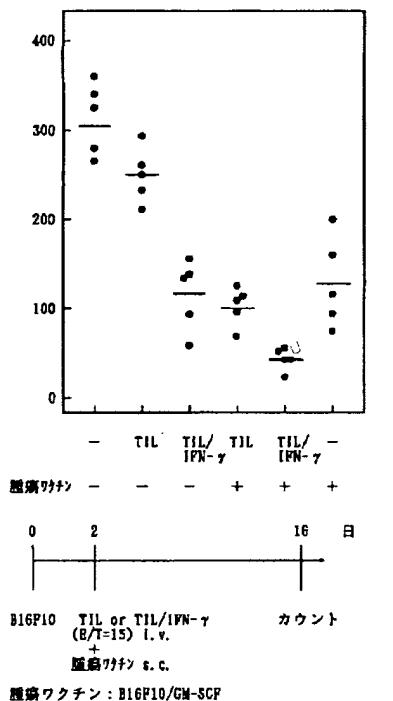
### [Drawing 2]



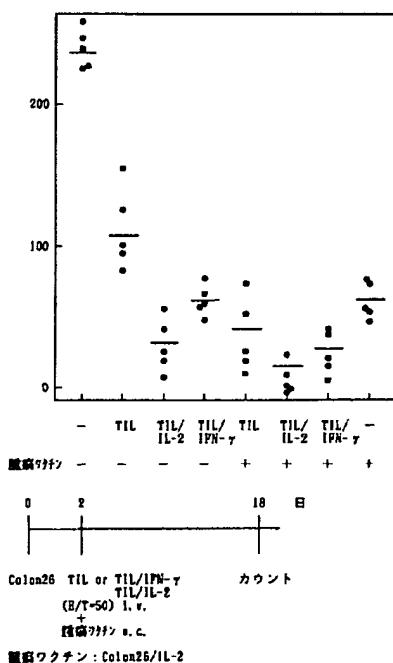
[Drawing 3]



[Drawing 4]



[Drawing 5]



(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-127542

(43)公開日 平成8年(1996)5月21日

(51) Int.Cl. <sup>a</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 48/00	ADU	H		
39/00				
C 1 2 N 5/10		7729-4B	C 1 2 N 5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全9頁)

(21)出願番号 特願平7-118382	(71)出願人 000173588 財団法人癌研究会 東京都豊島区上池袋1丁目37番1号
(22)出願日 平成7年(1995)5月17日	(72)発明者 渋田 洋文 東京都板橋区加賀2-3-1-310
(31)優先権主張番号 特願平6-216409	(72)発明者 菅野 晴夫 東京都杉並区南荻窪4-8-13
(32)優先日 平6(1994)9月9日	(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(33)優先権主張国 日本 (JP)	

(54)【発明の名称】 痛の遺伝子治療剤

(57)【要約】

【構成】 サイトカイン遺伝子を導入したエフェクター細胞とサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入した腫瘍ワクチンを含む癌の遺伝子治療剤。

【効果】 本発明の遺伝子治療剤は、高い抗腫瘍性を發揮し得、かつ癌転移抑制効果があるので、微小転移の癌治療に有用である。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 サイトカイン遺伝子を導入したエフェクター細胞とサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入した腫瘍ワクチンを含む癌の遺伝子治療剤。

【請求項 2】 エフェクター細胞が癌細胞の破壊に関するリバ球である請求項 1 記載の遺伝子治療剤。

【請求項 3】 リバ球が腫瘍浸潤リバ球(TIL)、リバホカイン活性化キラー細胞(LAK)、または細胞障害性T細胞(CTL)である、請求項 2 記載の遺伝子治療剤。

【請求項 4】 肿瘍細胞がメラノーマ細胞、腎癌細胞、乳癌細胞、偏平上皮癌、腺癌、移行上皮癌、肉腫、または神経膠腫(グロコマ)である、請求項 1 に記載の遺伝子治療剤。

【請求項 5】 エフェクター細胞に導入するサイトカイン遺伝子が、インターロイキン(IL)-2 遺伝子である請求項 1 に記載の遺伝子治療剤。

【請求項 6】 肿瘍細胞に導入するサイトカイン遺伝子が、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)遺伝子、インターロイキン(IL)-2 遺伝子の少なくとも一つである請求項 1 に記載の遺伝子治療剤。

【請求項 7】 サイトカイン遺伝子がアデノウイルスベクターによりエフェクター細胞に導入された請求項 1 記載の遺伝子治療剤。

【請求項 8】 サイトカイン遺伝子がレトロウイルスベクターにより腫瘍細胞に導入された請求項 1 記載の遺伝子治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は癌の遺伝子治療剤に関し、さらに詳細には、サイトカイン遺伝子を導入したエフェクター細胞とサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入した腫瘍ワクチンを含む癌の遺伝子治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】サイトカインは抗腫瘍効果を発揮するが、その作用機序により主に以下の 3 つに大別される。すなわち、①腫瘍壞死因子(TNF)- $\alpha$ 、 $\beta$ 、インターフェロン(IFN)- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、インターロイキン(IL)-1などのように、癌細胞に対して *in vitro* で直接的な増殖抑制ないし障害活性を示すもの、②インターロイキン(IL)-2、4、6、7、8、9、10、11、12などのように生体の免疫エフェクター機構を介して間接的に抗腫瘍効果を示すもの、③IL-3、IL-6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、幹細胞因子(SCF)などのように他の制癌療法に伴う生体の副作用の防止や治療に用いられているものである。

【0003】さらに、近年サイトカイン遺伝子導入による癌治療も試みられている。これらの一つはサイトカイン遺伝子をリバ球、例えばリバホカイン活性化キラー細胞(LAK)、細胞障害性T細胞(CTL)、腫瘍浸潤リバ球(TIL)などに導入し、導入細胞から分泌されるサイト

カインによりオートクライアあるいはパラクライアでリバ球を活性化して受動免疫能を高めたり、TIL に直接抗腫瘍性のある IFN または TNF 遺伝子を導入することにより腫瘍局所での抗腫瘍性を高めようという試みがなされている(Nishihara et al., Cancer Res., 48, 4730, 1988; Miyatake et al., J. Natl. Cancer Inst., 82, 217, 1990; Itoh et al., Jpn. J. Cancer Res., 82, 1203, 1991)。TIL へのサイトカイン遺伝子導入は、これまでレトロウイルスが利用されているが、導入効率が非常に悪く、当アプローチに対する障害となっている。

【0004】もう一つはレトロウイルスベクターなどにより腫瘍細胞にサイトカイン遺伝子を導入して腫瘍ワクチンとして用い、宿主の腫瘍特異的免疫細胞を誘導するものである。例えば、Fearonらは IL-2 遺伝子を導入したマウス大腸癌、悪性黒色腫を同系マウスに移植すると生着後自然退縮し、そのマウスは IL-2 遺伝子非導入腫瘍細胞の再移植に対して抵抗性をもつ免疫能を獲得することを報告している(Fearon et al., Cell, 60, 397, 1990)。しかしながら、これらはいずれも抗腫瘍性に対して必ずしも満足のいく成績が得られるものではなかったり、また転移抑制効果という面からは検討がなされておらず、癌転移に対し有望と思われるものは現状では報告されていない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、上記のような問題を解決すべく、より高い抗腫瘍活性を発揮し得、かつ癌転移の抑制にも有効な癌の遺伝子治療剤を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは前記のような課題について鋭意研究を行った結果、サイトカイン遺伝子を導入したエフェクター細胞とサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入した腫瘍ワクチンを併用すれば、効率よく全身免疫が誘導されて抗腫瘍効果と転移抑制効果が増強されることを見出し、本発明を完成了。

【0007】すなわち、本発明は、サイトカイン遺伝子を導入したエフェクター細胞とサイトカイン遺伝子を腫瘍細胞に導入した腫瘍ワクチンを含む癌の遺伝子治療剤を提供する。本発明にいう癌の遺伝子治療とは、サイトカイン遺伝子による抗腫瘍作用ならびに転移抑制作用の両面からの癌治療を企図するものである。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において使用されるサイトカイン遺伝子とは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン(IL)-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、インターロイキン-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )、インターロイキンレセプター1 アンタゴニスト(IL-1RA)、腫瘍壞死因子(TNF)- $\alpha$ 、リノホトキシン(LT)- $\beta$ 、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、インターフェロン(IFN)- $\gamma$ 、マクロ

ファージ遊走阻止因子 (MIF)、白血病抑制因子 (LIF)、T細胞活性化共刺激因子B7 (CD80) 並びにB7-2(CD86)、キット・リガンド、オンコスタチンM等の各種サイトカインをコードする遺伝子をいう。既に種々のサイトカインcDNAがクローニングされている [ヒト GM-CSF cDNAについては Wong et al., Science, 228, 810-815 (1985)、ヒトIL-2 cDNAについては Taniguchi et al., Nature, 302, 305-310 (1983)]、ヒト IFN- $\gamma$  cDNAについては Gray et al., Nature, 298, 859-863 (1982)]。本発明において使用されるサイトカイン遺伝子は、公知の技術を用いて細胞から単離して得られたcDNAであっても、また上記の文献等に開示される情報よりポリメラース連鎖反応 (PCR) 等の方法に従って化学的に合成されたものであってもよいが、免疫的拒絶反応を最小に抑えるために、また、治療効果を上げるために、ヒト由来のものが望ましい。

【0009】本発明においてエフェクター細胞とは、癌細胞の破壊の最終段階を担当し、破壊に直接携わる細胞集団をいい、具体的には腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、リンホカイン活性化キラー細胞 (LAK)、細胞障害性T細胞 (CTL) 等をいう。これらエフェクター細胞へのサイトカイン遺伝子の導入は、アデノウイルスベクターを用いることにより非常に効率良く行うことができる。ここで使用されるアデノウイルスベクターとしては、サイトカイン遺伝子のための挿入部位を含み、導入されたエフェクター細胞においてサイトカインを発現できるものであれば特に限定されないが、ヒト5型アデノウイルス由來の Adex1 [Saito, I. et al., J. Virol., 54, 711-719 (1985)] が好適に使用される。

【0010】一方、本発明にいう腫瘍ワクチンとは、上記のサイトカイン遺伝子をレトロウイルスベクターにより単離 (培養) 肿瘍細胞に導入し、これにX線照射を行って、サイトカインの産生は阻害せずに増殖のみを停止させたものである。この腫瘍ワクチンを宿主に投与することにより、宿主の腫瘍特異的免疫細胞を誘導することができる。

【0011】ここで使用されるレトロウイルスベクターは、サイトカイン遺伝子のための挿入部位を含み、導入された腫瘍細胞においてサイトカインを発現できるものであれば特に限定されないが、例えば、特表平6-503968号公報に開示される、MFG、 $\alpha$ -SCG、PLJ、pEm 等が挙げられる。サイトカイン遺伝子を挿入したレトロウイルスベクターは、目的の遺伝子が導入されたことを選択するマーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドとミックスして、 $\Psi$ 2、 $\Psi$ -Am、 $\Psi$ CRIP、 $\Psi$ CRE [Danos et al., PNAS, 85, 6460-6464 (1988)] 等のパッケージング細胞にカルシウム共沈殿法により導入する (コトランスクエクション)。さらにこれを薬剤G418の存在下で培養し、生存してコロニーを形成していく細胞を採取することによって、目的とする遺伝子の導入

されている細胞のみを採取することができる。次にこれらの細胞の培養上清を用いてNIH3T3マウス纖維芽細胞、B16マウスマラノーマ細胞など各種腫瘍細胞に感染させ、最終的には細胞の染色体に導入された安定な遺伝子導入細胞として、サザンハイブリダイゼーションによって確認することができる。また、感染細胞から分泌されるサイトカインの量は、ELISA等の免疫学的アッセイにより測定することができる。

【0012】次に、サイトカイン遺伝子が導入された腫瘍細胞を、通常10,000~150,000 rad のX線を照射後、これを腫瘍ワクチンとして用いる。ここでいう腫瘍細胞は、メラノーマ細胞ないし腎癌細胞であるが、他の腫瘍細胞、例えば乳癌細胞、扁平上皮癌、腺癌、移行上皮癌、肉腫、神経膠腫 (グリオーマ) 等も用いることができる。上記のようにしてそれぞれ調製したサイトカイン遺伝子導入エフェクター細胞と腫瘍ワクチンはそのまま用いることができるが、医薬的に許容できる賦形剤とともに医薬組成物として、溶液、懸濁液、ゲル等の形態に製剤化して投与することもできる。

【0013】本発明の遺伝子治療剤の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内等の全身投与の他に、癌原病巣に対して、または癌種に対応した予想転移部位に対して、局所注射、経口投与等の局所投与を行うことができる。さらに、本発明の遺伝子治療剤の投与にあたっては、カテーテル技術、遺伝子導入技術、または外科的手術等と組み合わせた投与形態をとることもできる。本発明の遺伝子治療剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、一般に、成人では一日当たりサイトカイン遺伝子の重量にして、約0.1~100 mgの範囲が適当である。

#### 【0014】

【発明の効果】本発明によれば、ヒト、またはマウス、サル、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ等の動物に高い抗腫瘍性を発揮し得、かつ癌転移の抑制にも有効な遺伝子治療剤が提供され、微小転移の癌治療に有用である。

#### 【0015】

【実施例】本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明する。これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【参考例1】マウスIL-2、マウスGM-CSF、及びマウスIFN- $\gamma$ のcDNAは、マウスの脾リンパ球のmRNAを用いてRT-PCR (Reverse transcripton-polymerase chain reaction) 法により調製した。PCRを行ふに際し、マウスIL-2に対しては以下に示すプライマー#479, #480、マウスGM-CSFに対しては以下に示すプライマー#477, #478、マウスIFN- $\gamma$ に対しては以下に示すプライマー#485, #486をそれぞれ使用した。

【0016】プライマー (#479) : CCGAATTCTAGACACC AT G TAC ACC ATG CAG CTC GCA TCC TGT G

プライマー (#480) : C TGT CAA AGC ATC ATC TCA ACA A

GC CCT CAA TAA GGATCC CC  
 プライマー(#477) : CCGAATTCTAGACACC ATG TGG CTG CA  
 G AAT TTA CTT TTC CTG GGC  
 プライマー(#478) : C CCC TTT GAA TGC AAA AAA CCA A  
 GC CAA AAA TGA GGATCC GG  
 プライマー(#485) : CC GAA TTC TAGA CACC ATG AAC CC  
 T ACA CAC TGC ATC TTG CC  
 プライマー(#486) : C AGG AAG CGG AAA AGG AGT CGC T  
 GC TGA GGATCCGG

【0017】〔実施例1〕 サイトカイン遺伝子導入エフェクター細胞 (TIL/IL-2) の調製

(1) マウスマラノーマB16F10由来TILの調製  
 TILの調製は、Alexander, R.B. et al., J. Immunol., 145, 1615-1620 (1990)、Matis, L.A. et al., Methods Enzymol., 150, 342-351 (1987)、Livingstone, A. et al., Methods Enzymol., 150, 325-333 (1987)記載の方法に改良を加えて以下のようにして行った。6～10週令の雌性C57BL/6マウス(Charles River Japanより購入)に移植したマウスマラノーマB16(ATCC CRL6322)の高転移株であるB16F10(Whitehead Institute Dr.Glenn Dranoffより入手)の新鮮な腫瘍塊を完全培養地(CM)中に4℃で $5 \times 10^7$  cells/ml懸濁した。CMは、熱不活化した10%ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、 $5 \times 10^{-5}$  M 2-メルカプトエタノール、100U/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシン、0.5 μg/mlアンホテリシンB、10mM 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、及び70U/ml組み換えヒトIL-2(塩野義製薬(株)より入手)を添加したRPMI 1640である。TILを等量の抗CD-8-結合免疫吸着ビーズと $1 \times 10^8$ /mlで混合し、4℃で2時間インキュベートした。TILが付着したビーズはペレット化し、冷CMで3回洗浄し、CM中に $1 \times 10^7$  beads/ml懸濁し、24ウェルの組織培養プレートに播き、37℃、5%CO<sub>2</sub>下でインキュベートした。培養1日後、TILから分離したビーズをペレット化し、除去した。分離したTILにウェル当たり $2 \times 10^5$  個の照射(10,000rad)腫瘍細胞、ならびに $1 \times 10^6$  個の照射(3,000rad)正常脾細胞を用いて刺激した。in vitro刺激を7日から14日毎に繰り返した。コンフルエントになったときにTILを分取し、新たなCM中に $2 \times 10^5$  cells/ml再懸濁した。

【0018】(2) アデノウイルスによるマウスIL-2遺伝子のTILへの導入

組み換えアデノウイルスを調製する方法は、Saito, I. et al., J. Virol., 54, 711-719 (1985)の変法により行った。すなわち、サイトメガロウイルスエンハンサー、チキンβ-アクチンプロモーター、参考例1で調製したマウスIL-2のcDNA配列、ラビット-β-グロビンポリ

(A) シグナル配列からなる発現ユニット[Niwa, H. et al., J. Gene 108, 193-200 (1991)]を、E1A, E1B, お

よびE3遺伝子を欠く31kbのアデノウイルスタイプ5を含む42kbコスミドであるpAdex1w(鎌ヶ江裕美、原田志津子、斎藤泉、実験医学バイオマニュアル4, 189-204、1994、羊土社)のSwI制限酵素部位に挿入することによって発現用コスミドカセットを構築した(図1)。この発現用コスミドカセットとアデノウイルスDNA-ターミナル蛋白複合体(DNA-TPC)を293細胞(ATCC CRL1573)にカルシウム共沈法によりコトランスクレクトした。発現カセットの入った組み換えウイルスは適当な制限酵素による消化によって確認した。組み換えウイルスは統いて293細胞で増殖させ、ウイルス溶液を-80℃で貯蔵した。ウイルスストックのタイマーは293細胞上でのブラークアッセイによって決定した。(1)で調製したTILへのアデノウイルスのin vitro感染のために、培養液を12ウェル培養プレートに播いたTIL細胞から除き、各ウェルにウイルスストック150 μlを加えた。37℃で1時間インキュベーション後、増殖用培地を添加し、TIL細胞を2～3日培養し、マウスIL-2遺伝子導入TIL細胞(TIL/IL-2)を得た。

【0019】〔実施例2〕 腫瘍ワクチン(B16F10/IL-2+GM-CSFワクチン)の調製

(1) マウスIL-2、マウスGM-CSF高タイマー組み換えレトロウイルス産生クローンの調製  
 レトロウイルスベクターMFG(Dranoff, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3539-3543, 1993)の2つのLTR(Long Terminal Repeat)含むEagI/BamHIフラグメント(5200bp)、EagI/XbaIフラグメント(1000bp)、ならびに参考例1で調製したマウスIL-2、マウスGM-CSFの各cDNAのXbaI/BamHIフラグメントの3つをT4DNAライゲースでつないでプラスミドに組み込んだ(図2)。得られたプラスミドとpPGKneo[H. Takeshima et al., Nature, 369, 556-559 (1994)]をカルシウム共沈法によりpCRIP(Danos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6460 (1988))に導入し、これをG-418(GIBCO, 1mg/ml)を含む培地にて1週間培養し、コロニーを形成してくる細胞を採取した。次にこれらの細胞の培養上清をpolybrene(Sigma, 8 μg/ml)存在下、NIH3T3マウス綿維芽細胞(ATCC CRL1658)に感染させた。感染細胞のゲノムDNAを単離し、ウイルスのタイマーをサザンプロット法で測定し、組み込まれたプロウイルスのコピー数として評価した。NIH3T3への導入効率は通常、1細胞につきプロウイルスの組み込みで1～3コピー数であった。また、感染細胞より分泌されるサイトカインは、培地10mlを含む10-cmディッシュに $1 \times 10^6$  細胞を播いた48時間後に、ELISA(Endogen)によりアッセイした(表1)。

【0020】

【表1】

cDNA	タイター（コピー数）	発現量
マウスIL-2	2.0	6350 IU/ml
マウスGM-CSF	2.0	13.5 ng/ml

【0021】(2) 腫瘍ワクチン(B16F10/IL-2+GM-CSFワクチン)の調製

(1) で選択したマウスIL-2、マウスGM-CSFそれぞれの高タイター組み換えレトロウイルス産生クローンをマウスマラノーマB16(ATCC CRL 6322)の高転移株であるB16F10(Whitehead Institute Dr.Glenn Dranoffより入手)に導入した。該遺伝子導入細胞は、10% ウシ胎児血清および2mM グルタミンを添加したダルベッコのイーグル培地で維持し、トリプシン/EDTAで処理し、HITACHI MBR-1505R X-ray generator を用い、10,000rad のX線を照射した。照射細胞はHBSS(Hank's Balanced Salt Solution)で2回洗浄し、 $5 \times 10^6$  cell/ml の濃度でHBSSに再懸濁し、腫瘍ワクチン(B16F10/IL-2 + GM-CSFワクチン)を得た。

【0022】〔実施例3〕 サイトカイン遺伝子導入エフェクター細胞(TIL/IFN-γ)の調製

(1) マウスマラノーマB16F10由来TILの調製  
実施例1 (1)と同様の方法により調製した。  
(2) アデノウイルスによるマウスIFN-γ遺伝子のTILへの導入  
組み換えアデノウイルスを調製する方法は、Saito, I. et al., J. Virol., 54, 711-719 (1985) の変法により行った。すなわち、サイトメガロウイルスエンハンサー、チキンβ-アクチンプロモーター、参考例1で調製したマウスIFN-γのcDNA配列、ラビット-β-グロビンポリ(A)シグナル配列からなる発現ユニット[Niwa, H. et al., J. Gene 108, 193-200 (1991)]を、E1A, E1B, およびE3遺伝子を欠く31kbのアデノウイルスタイプ5を含む42kbコスミドであるpAdex1cw(鐘ヶ江裕美、原田志津子、斎藤泉、実験医学バイオマニュアル4, 189-204、1994、羊土社)のCIaI制限酵素部位に挿入することによって発現用コスミドカセットを構築した(図1)。この発現用コスミドカセットとアデノウイルスDNAヘーターミナル蛋白複合体(DNA-TPC)を293細胞(ATCC CRL1573)にカルシウム共沈法によりコトランスクェクトした。発現カセットの入った組み換えウイルスは適当な制限酵素による消化によって確認した。組み換えウイルスは統いて293細胞で増殖させ、ウイルス溶液を-80℃で貯蔵した。ウイルスストックのタイターは293細胞上でのブラークアッセイによって決定した。(1)で調製したTILへのアデノウイルスのin vitro感染のために、培養液を12ウェル培養プレートに播いたTIL細胞から除き、各ウェルにウイルスストック150 μlを加えた。37℃で1時間インキュベーション後、増殖用培地を添加し、TIL細胞を2~3日培養し、マウスIFN-γ遺伝子導入TIL細胞

(TIL/IFN-γ)を得た。

【0023】〔実施例4〕 腫瘍ワクチン(B16F10/GM-CSFワクチン)の調製

(1) マウスGM-CSF高タイター組み換えレトロウイルス産生クローンの調製

実施例2(1)と同様の方法により調製した。

(2) 腫瘍ワクチン(B16F10/GM-CSFワクチン)の調製

(1) で選択したマウスGM-CSFの高タイター組み換えレトロウイルス産生クローンをマウスマラノーマB16(ATCC CRL 6322)の高転移株であるB16F10(Whitehead Institute Dr.Glenn Dranoffより入手)に導入した。該遺伝子導入細胞は、10% ウシ胎児血清および2mM グルタミンを添加したダルベッコのイーグル培地で維持し、トリプシン/EDTAで処理し、HITACHI MBR-1505R X-ray generator を用い、10,000rad のX線を照射した。照射細胞はHBSSで2回洗浄し、 $5 \times 10^6$  cell/ml の濃度でHBSSに再懸濁し、腫瘍ワクチン(B16F10/GM-CSFワクチン)を得た。

【0024】〔実施例5〕 サイトカイン遺伝子導入エフェクター細胞(TIL/IL-2, TIL/IFN-γ)の調製

(1) マウス大腸癌Colon 26由来TILの調製  
TILの調製は、Alexander, R.B. et al., J. Immunol., 145, 1615-1620 (1990)、Matis, L.A. et al., Methods Enzymol., 150, 342-351 (1987)、Livingstone, A. et al., Methods Enzymol., 150, 325-333 (1987)記載の方法に改良を加えて以下のようにして行った。6~10週令の雌性BALB/Cマウス(Charles River Japanより購入)に移植したマウス大腸癌Colon 26の新鮮な腫瘍塊を完全培養培地(CM)中に4℃で $5 \times 10^7$  cells/ml 懸濁した。CMは熱不活化した10% ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、 $5 \times 10^{-5}$  M 2-メルカプトエタノール、100U/mlペニシリン、100 μg/mlストレプトマイシン、0.5 μg/ml アンホテリシンB、10mM 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、及び700U/ml組み換えヒトIL-2(塩野義製薬(株)より入手)を添加したRPMI 1640である。TILを等量の抗CD-8結合免疫吸着ビーズと $1 \times 10^8$  /mlで混合し、4℃で2時間インキュベートした。TILが付着したビーズはペレット化し、冷CMで3回洗浄し、CM中に $1 \times 10^7$  beads/ml 懸濁し、24ウェルの組織培養プレートに播き、37℃、5%CO<sub>2</sub>下でインキュベートした。培養1日後、TILから分離したビーズをペレット化し、除去した。分離したTILにウェル当たり $2 \times 10^5$  個の照射(10,000rad)腫瘍細胞、ならびに $1 \times 10^6$  個の照射(3,000rad)正常脾細胞を用いて刺激した。in vitro刺激を7日から14日毎に繰り返した。コンフルエントになったときにTILを分取し、新たなCM中に $2 \times 10^5$  cells/ml再懸濁

した。

【0025】(2) アデノウイルスによるマウスIL-2遺伝子のTILへの導入

実施例1(2)と同様の方法により上記(1)で調製したTILへ参考例1で調製したマウスIL-2cDNAを導入し、マウスIL-2遺伝子導入TIL細胞(TIL/IL-2)を得た。

(3) アデノウイルスによるマウスIFN- $\gamma$ 遺伝子のTILへの導入

実施例3(2)と同様の方法により上記(1)で調製したTILへ参考例1で調製したマウスIFN- $\gamma$ cDNAを導入し、マウスIFN- $\gamma$ 遺伝子導入TIL細胞(TIL/IFN- $\gamma$ )を得た。

【0026】[実施例6] 肺癌ワクチン(Colon26/IL-2ワクチン)の調製

(1) マウスIL-2高タイマー組み換えレトロウイルス産生クローニングの調製

実施例2(1)と同様の方法により調製した。

(2) 肺癌ワクチン(Colon26/IL-2ワクチン)の調製

(1)で選択したIL-2高タイマー組み換えレトロウイルス産生クローニングをマウス大腸癌Colon26に導入した。該遺伝子導入細胞は、10%ウシ胎児血清および2mMグルタミンを添加したRPMI1640培地で維持し、HITACHI MBR-1505

R X-ray generator を用い、10,000rad のX線を照射した。照射細胞はHBSSで2回洗浄し、 $5 \times 10^6$  cell/ml の濃度でHBSSに再懸濁し、肺癌ワクチン(Colon26/IL-2ワクチン)を得た。

【0027】[試験例1] 肺転移系における効果試験(1)

6~10週令の雌性C57BL/6マウス(Charles River Japanより購入)に $4 \times 10^5$ 個のマウスマラノーマB16F10細胞を尾静脈に接種し、肺転移を誘発させた。2日後にTIL単独、あるいは実施例1にて調製したTIL/IL-2を $4 \times 10^6$ 個静脈より投与した[E/T ratio=10:E/Tはエフェクター細胞(TIL/IL-2)数/腫瘍細胞(B16F10)数を表す]。同時に実施例2にて調製したB16F10/IL-2+GM-CSFワクチンを $5 \times 10^5$ 個皮下投与した。肺転移誘発より16日後に解剖して肺に生じた転移結節数を数えた。比較としてTIL単独、あるいはTIL/IL-2投与のみでワクチン投与を行わないものについても試験した。結果を表2ならびに図3に示す。

【0028】

【表2】

薬剤		肺転移結節数	コントロール比(%)
エフェクター	ワクチン		
—	—	208±37	100.0
TIL	—	176±25	85.4
TIL	B16F10/IL-2 + GM-CSF	87±26	42.2
TIL/IL-2	—	138±34	67.0
TIL/IL-2	B16F10/IL-2 + GM-CSF	44±25	21.4

【0029】TIL/IL-2とB16F10/IL-2+GM-CSFワクチンを併用して投与した群では特に顕著な転移結節数の減少が認められ、肺への癌転移抑制効果が最大となることが確認できた。

【0030】[試験例2] 肺転移系における効果試験(2)

6~10週令の雌性C57BL/6マウス(Charles River Japanより購入)に $3 \times 10^5$ 個のマウスマラノーマB16F10細胞を尾静脈に接種し、肺転移を誘発させた。2日後にTIL単独、あるいは実施例3にて調製したTIL/IFN- $\gamma$ を4.5

$\times 10^6$ 個静脈より投与した(E/T ratio=15)。同時に実施例4にて調製したB16F10/GM-CSFワクチンを $5 \times 10^5$ 個皮下投与した。肺転移誘発より16日後に解剖して肺に生じた転移結節数を数えた。比較としてTIL単独、TIL/IFN- $\gamma$ 投与のみでワクチン投与を行わないもの、あるいはB16F10/GM-CSFワクチン投与のみについても試験した。結果を表3ならびに図4に示す。

【0031】

【表3】

薬剤		肺転移結節数	コントロール比(%)
エフェクター	ワクチン		
—	—	303±29	100.0
TIL	—	253±26	83.5
TIL/IFN- $\gamma$	—	117±35	38.6
TIL	B16F10/GM-CSF	102±17	33.7
TIL/IFN- $\gamma$	B16F10/GM-CSF	52±9	17.2
—	B16F10/GM-CSF	133±45	43.9

【0032】TIL/IFN- $\gamma$ とB16F10/GM-CSFワクチンを併用して投与した群では特に顕著な転移結節数の減少が認められ、肺への癌転移抑制効果が最大となることが確認できた。

【0033】[試験例3] 肺転移系における効果試験(3)

6~10週令の雌性BALB/Cマウス(Charles River Japanより購入)に $2 \times 10^5$ 個のマウスマラノーマ大腸癌Colon

26細胞を尾静脈に接種し、肺転移を誘発させた。2日後にTIL単独、あるいは実施例5にて調製したTIL/IL-2またはTIL/IFN- $\gamma$ を $1 \times 10^6$ 個静脈より投与した(E/T ratio=50)。同時に実施例6にて調製したColon26/IL-2ワクチンを $5 \times 10^5$ 個皮下投与した。肺転移誘発より18日後に解剖して肺に生じた転移結節数を数えた。比較とし

てTIL単独、TIL/IFN- $\gamma$ 投与のみでワクチン投与を行わないもの、あるいはColon26/IL-2ワクチン投与のみについても試験した。結果を表4ならびに図5に示す。

#### 【0034】

#### 【表4】

薬剤		肺転移結節数	コントロール比(%)
エフェクター	ワクチン		
—	—	228±11	100.0
TIL	—	105±29	46.1
TIL/IL-2	—	25±14	11.0
TIL/IFN- $\gamma$	—	54±11	23.7
TIL	Colon26/IL-2	32±21	14.0
TIL/IL-2	Colon26/IL-2	9±8	3.9
TIL/IFN- $\gamma$	Colon26/IL-2	21±12	9.2
—	Colon26/IL-2	53±10	23.2

【0035】 TIL/IFN- $\gamma$ とColon26/IL-2ワクチン、あるいはTIL/IL-2とColon26/IL-2ワクチンを併用して投与した群では特に顕著な転移結節数の減少が認められ、肺への癌転移抑制効果が最大となることが確認できた。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 IL-2遺伝子導入に用いる発現用カセットの構築を示す。

【図2】 IL-2、またはGM-CSF遺伝子導入に用いる組み換えレトロウイルスベクターの構築を示す。

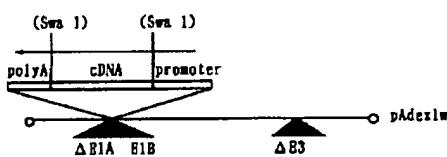
【図3】 サイトカイン遺伝子(IL-2)を導入したマウスマラノーマ(B16F10)由来エフェクター細胞(TIL)とサイトカイン遺伝子(IL-2+GM-CSF)を導入したマウスマラ

ノーマ(B16F10)ワクチンによる癌転移抑制効果の結果を示す。

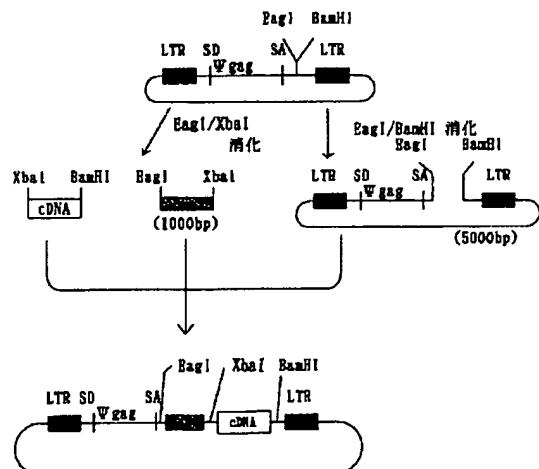
【図4】 サイトカイン遺伝子(IFN- $\gamma$ )を導入したマウスマラノーマ(B16F10)由来エフェクター細胞(TIL)とサイトカイン遺伝子(GM-CSF)を導入したマウスマラノーマ(B16F10)ワクチンによる癌転移抑制効果の結果を示す。

【図5】 サイトカイン遺伝子(IL-2またはIFN- $\gamma$ )を導入したマウスマラノーマ(B16F10)由来エフェクター細胞(TIL)とサイトカイン遺伝子(IL-2)を導入したマウスマラノーマ(B16F10)ワクチンによる癌転移抑制効果の結果を示す。

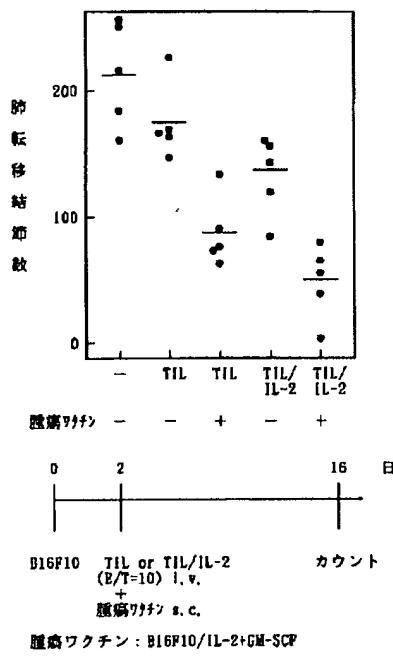
【図1】



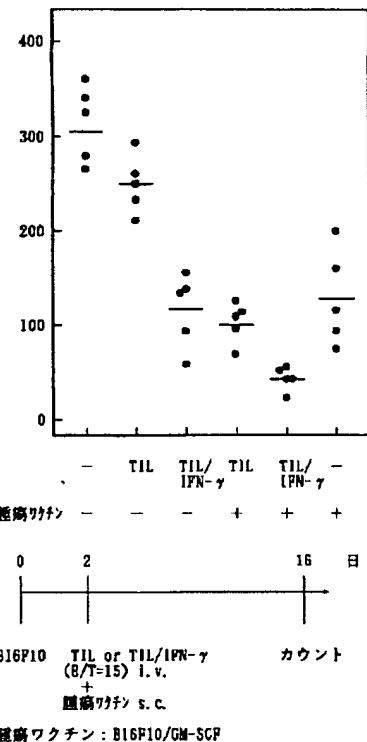
【図2】



【図3】



【図4】



【図 5】

